

文章编号:1001-6880(2016)11-1747-05

# 巨尾桉不同树龄及染虫状态桉叶油的成分分析

周莉君<sup>1,2</sup>,丁 涛<sup>1</sup>,杨志荣<sup>1</sup>,陈 亮<sup>3</sup>,白林含<sup>1\*</sup><sup>1</sup>四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室,成都 610064;<sup>2</sup>四川农业大学生命科学学院,雅安 625000; <sup>3</sup>四川省林业信息中心,成都 610081

**摘要:**为了考察树龄、虫害与巨尾桉叶油成分的相互关系,更好的开发桉树资源,采用水蒸气蒸馏法提取不同树龄(4~6年生)巨尾桉叶油,用GC-MS法对巨尾桉叶油主要化学成分进行鉴定,分析不同树龄和染虫状态的桉叶油成分变化规律。结果表明,随着树龄增加,桉叶油总量逐年增加;生长年限不同,桉叶油中物质的组成及相对含量存在差异。主要成分相对含量变化情况为:桉油醇、乙酸松油酯含量随树龄逐年上升;d-柠檬烯、 $\alpha$ -蒎烯相对含量在4到5年达到峰值,5年后开始下降;莰烯、 $\beta$ -蒎烯和 $\alpha$ -松油醇逐年下降。被云斑天牛感染的林地,桉油醇、 $\alpha$ -蒎烯、 $\beta$ -蒎烯、莰烯呈相对下降趋势,而d-柠檬烯、 $\alpha$ -松油醇、乙酸松油酯的含量上升。

**关键词:**巨尾桉;挥发油;树龄;云斑天牛

中图分类号:Q946.8

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.11.011

## Chemical Constituents of Essential Oil from the Leaves of *Eucalyptus grandis × E. urophylla* in Different Years Old and Insect Infection Status

ZHOU Li-jun<sup>1,2</sup>, DING Tao<sup>1</sup>, YANG Zhi-rong<sup>1</sup>, CHEN Liang<sup>3</sup>, BAI Lin-han<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China; <sup>2</sup>College of Life Sciences, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625000, China; <sup>3</sup> Sichuan Provincial Forestry Information Center, Chengdu 610081, China

**Abstract:** To investigate the relationship between different tree age/insect infection status and chemical constituents of essential oil from the leaves of *Eucalyptus grandis × E. urophylla*, aiming to empolder it efficiently. *Eucalyptus* essential oil was extracted by steam distilling (SD) and analyzed by GC-MS method. The results showed that along with the increasing of tree age, the amount of *Eucalyptus* oil increased year by year. However, the composition and relative contents of essential oil varied yearly. The changes of relative content of main component was: Cineole and terpinyl acetate increased with time increments; Camphene,  $\beta$ -pinene and  $\alpha$ -terpineol decreased annually; d-Limonene and  $\alpha$ -pinene reached a peak in 4 to 5 years, and then began to decline. While infected by *Batocera horsfieldi* (HoPe), the amount of cineole,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene and camphene was relatively decreased, but the contents of d-limonene,  $\alpha$ -terpineol and terpinyl increased.

**Key words:** *Eucalyptus grandis × E. urophylla*; essential oil; age; *Batocera horsfieldi* (HoPe)

巨尾桉(*Eucalyptus grandis × E. urophylla*)是人工杂交的桉树杂种,其造林成活率高、速生高产、产材量高、品质好、适应性强,是目前巨尾桉无性系中抗寒能力最强的无性系品种,也是我国热带和亚热带地区引种成功的主要造林树种。四川省洪雅县余坪镇自2008年开始引种巨尾桉无性系品种川桉C1

号(广林9号),已栽植130多公顷,仅此一项就为农民年均增收近2000万元。

云斑天牛[*Batocera horsfieldi* (HoPe)]又名云斑白条天牛,属鞘翅目天牛科,在西南、华南、中南、华北、西北及台湾等地分布广泛,是杨、悬铃木、核桃、油橄榄、泡桐、桉、山楂等10多种用材林和经济林木的主要蛀干害虫<sup>[1]</sup>。主要以幼虫在寄主树干内钻蛀危害,树干内的蛀道常常纵横交错,在短期内造成整株树木死亡或风折,木材完全失去利用价值,树木的生态价值也损失殆尽<sup>[2]</sup>。云斑天牛在当地通常2

~3年发生1代,因此1~2年生树或枝条不受危害,4~6年生危害较重。虫害严重影响了桉树的成才和成林,造成了大量经济损失。云斑天牛由于隐蔽性和抗逆性极强,防治比较困难。但调查中发现,在林场同一片区,成块种植的林地出现了有的林地染虫而相邻林地却未染虫的现象。

植物的年龄、生理状态、分布、栽培情况、环境等变化和其他生物如昆虫、微生物等活动往往会对植物挥发性成分的组成和含量造成显著影响<sup>[3,4]</sup>。桉叶挥发油中含有大量低毒或中毒类物质,包括大量醇类、萜烯类和芳香类物质,在不同地区的桉树成分组成和相对含量的变化也非常明显<sup>[5-8]</sup>。研究资料表明,天牛在寻找寄主的识别过程中,寄主植物释放的挥发性物质,尤其是萜烯类、芳香类和醇类物质在植物与昆虫间的化学通讯中起着关键作用<sup>[9]</sup>。

本试验以余坪林场中4~6年生桉树林为研究对象,分别选择染虫与未染虫的相邻的林地采集桉叶,分析桉叶油的主要化学成分及其染虫后的变化规律,考察虫害与桉树次生代谢产物挥发油成分的相互关系,为探索桉叶油成分对虫害的引诱和忌避效果及利用桉叶油成分进行诱杀、忌避害虫的可行性提供理论基础。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料和试剂

巨尾桉叶采于洪雅余坪林场。地处 $29^{\circ}52'26.63''N$ , $103^{\circ}28'49.41''E$ ,海拔494 m,中亚热带湿润气候,年降雨量1435.5 mm,年平均气温16.6°C。

分别从4、5、6年生的未染虫和染虫的相邻林地随机选择巨尾桉上采集新鲜叶片各5 kg。对样品进行编号:1号为4年生未染虫林地叶片,2号为4年生染虫林地叶片,3号为5年生未染虫林地叶片,4号为5年生染虫林地叶片,5号为6年生未染虫林地叶片,6号为6年生染虫林地叶片。所有样品洗净,经自然风干后,粉碎成细粉,过20目筛备用。

蒸馏水,石油醚(沸点30~60°),乙酸乙酯,无水乙醇,无水硫酸钠。所用化学试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

挥发油提取器(成都蜀都公司),旋转蒸发仪(上海申顺生物科技有限公司,SENCOR201),岛津气质联用仪(日本岛津公司,GCMS-QP2010 Plus-shimadzu)。

## 2 实验方法

### 2.1 桉叶油的提取

取100 g巨尾桉叶粉末置1000 mL圆底蒸馏瓶中,加600 mL蒸馏水,按照2015年版《中国药典》通则挥发油测定法“甲法”(简称SD法)测定,保持微沸,5 h后观察到提取器中的油量不再增加,停止加热,馏出蒸气冷凝后油水分层,收集油层。经石油醚(30~60°)萃取,分液漏斗分离,收集石油醚层,用旋转蒸发仪低温回收溶剂,油层加入经活化的无水硫酸钠脱水,抽滤,得无色透明油状物,放置一段时间后变为淡黄色油状物。平行实验3次取平均值,计算桉叶油的平均得率。密封避光保存备用。

### 2.2 桉叶油的成分测定

#### 2.2.1 色谱条件

弹性石英毛细管色谱柱HP-5MS(0.25 mm×30 m×0.25 μm),采用升温程序:40 °C保持5 min,以5 °C/min的升温速度升至100 °C,保持10 min,再以5 °C/min的升温速度升至160 °C,保持10 min,再以5 °C/min的升温速度升至280 °C,保持10 min。载气为高纯氦气,进样量1 μL,分流比1:100,进样口温度260 °C,接口温度220 °C。

#### 2.2.2 质谱条件

电子轰击(EI)离子源,电子能量70 eV,电子倍增器电压1.5 kV,质量扫描范围33~600 amu,全扫描方式。进样量:1.0 μL。检索数据库为NIST02标准谱库,采用面积归一化法计算各成分相对含量。

## 3 结果与分析

### 3.1 不同树龄及染虫状态下桉叶油得率变化

通过SD法分别得到4、5、6年生桉叶油,三次重复求平均值,未染虫林地得油率分别为0.62%、0.73%和0.76%,染虫林地得油率分别为0.65%、0.72%和0.78%。可见随着树龄增加,桉叶油含量逐年增加。染虫造成林木倒伏,但没有造成桉叶油得率大幅度减少。桉叶油具有广泛的生物活性<sup>[10]</sup>,可应用于香料、化工、医药等行业。对已遭虫害造成损失的林木,收集倒伏桉树的桉叶提取桉叶油可以减少损失。

### 3.2 不同树龄及染虫状态下桉叶油成分及其含量变化

对桉叶油进行GC-MS分析,采用计算机对各峰质谱图进行NIST标准谱库检索,根据质谱裂解规律

进行核对,参考标准图谱和相关文献确定其化学结构。利用峰面积归一化法计算各组分的相对含量(表1)。可以看出,采用SD法提取的桉叶油中,1号林地采集叶共鉴定出了27种成分,占总含量的的95.85%。2号林地共鉴定出了25种成分,占总含量的的99.25%。3号林地共鉴定出了26种成分,占总含量的的99.3%。4号林地共鉴定出了28种

成分,占总含量的的98.94%。5号林地共鉴定出了26种成分,占总含量的的98.99%。6号林地共鉴定出了25种成分,占总含量的的96.53%。可见树龄不同,桉叶油成分和相对含量也有差异,这可能是由于次级代谢物质在桉树体内合成的时期不同,或是物质在体内相互转换等原因造成的,有待做进一步研究。

表1 不同林地巨尾桉叶油成分及相对含量

Table 1 Constituents and their relative contents in *Eucalyptus* essential oil in different woodland

保留时间 RT, min	化合物名称 Compounds name	相对含量 Relative contents (%)					
		无虫 Nonhost			染虫 Host		
		4年生 4 years old	5年生 5 years old	6年生 6 years old	4年生 4 years old	5年生 5 years old	6年生 6 years old
9.525	α-Pinene	19.55	21.89	21.17	16.85	18.05	17.11
9.88	Camphene	0.73	0.68	0.54	0.54	0.49	0.45
10.553	β-Pinene	0.10	0.07	0.06	0.07	0.06	0.06
11.382	Isoamyl butyrate	0.22	0.18	0.10	0.10	0.09	0.13
11.65	o-Cymene	0.44	0.25	0.17	0.17	0.22	0.28
11.775	d-Limonene	2.12	3.59	3.21	2.63	3.74	3.43
11.814	Cineole	41.94	43.19	43.88	45.6	39.54	39.23
12.904	6-Nonynoic acid methyl ester	0.09	-	-	-	0.07	0.08
13.349	Terpinolene	0.27	0.25	0.3	0.24	0.35	0.30
13.656	2-Dodecenal	0.10	0.11	0.15	0.09	0.13	0.14
13.8	Butanoic acid,2-methyl-,3-methylbutyl ester	0.09	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07
14.111	Fenchol, exo-	1.47	1.3	1.19	1.49	1.40	1.32
14.509	Camphenol,6-	0.58	0.48	0.46	0.57	0.54	0.41
14.986	(-) -trans-Pinocarveol	0.89	0.58	0.56	0.86	0.80	0.64
15.343	Camphene hydrate	0.18	0.15	0.12	0.16	0.07	0.16
16.021	L(-)-Borneol	4.72	4.05	3.68	5.00	4.24	4.20
16.503	(-) -4-TerpineolLinalool	0.32	0.31	0.31	0.34	0.32	0.35
17.094	α-Terpineol	9.85	8.67	8.21	10.52	10.17	9.59
18.516	Phellandral (6CI)	0.23	0.10	-	0.18	0.16	0.16
18.996	Bicyclo[6.1.0]nonane,9-(methyl ethylidene)	-	0.07	0.08	0.09	0.11	-
22.517	Isopulegol acetate	0.20	0.12	0.35	0.14	0.21	-
22.634	Bornyl acetate	0.12	0.11	0.22	0.16	0.13	-
25.567	2-Oxabicyclo[2.2.2]octan-6-ol,1,3,3-trimethyl-,acetate	0.12	-	0.13	-	0.13	0.16
25.914	Terpinyl acetate	10.56	11.55	12.41	12.28	15.65	16.67
28.827	Aromadendrene	0.53	0.78	0.83	0.58	0.79	0.84
30.073	Ocimene	0.10	0.18	0.09	-	0.10	0.25
34.145	(-) -Spathulenol	0.16	0.29	0.32	0.28	0.57	0.26
34.36	Caryophyllene oxide	0.17	0.27	0.37	0.23	0.74	0.24

表2中比较了桉叶油中被报道较多的主要成分及其相对含量,可见随着树龄增加,桉叶油中物质的组成及相对含量存在显著差异。主要成分相对含量变化情况为:桉油醇、乙酸松油酯相对含量逐年上升;α-蒎烯、d-柠檬烯相对含量在四到五年达到峰

值,五年后开始下降;莰烯、β-蒎烯和α-松油醇逐年下降。被云斑天牛感染的林地,桉油醇、α-蒎烯、β-蒎烯、莰烯呈相对下降趋势,而d-柠檬烯、α-松油醇、乙酸松油酯的含量上升。

表2 不同林地巨尾桉叶油主要成分及相对含量比较

Table 2 The main composition and their relative contents in *Eucalyptus* essential oil in different woodland

保留时间 RT, min	化合物名称 Compounds name	虫情 Insect Condition	相对含量 Relative content (%)		
			4年生 4 Years old	5年生 5 Years old	6年生 6 Years old
9.525	α-蒎烯 α-Pinene	无虫 Nonhost	19.55	21.89	21.17
		染虫 Host	16.85	18.05	17.11
9.88	莰烯 Camphene	无虫 Nonhost	0.73	0.68	0.54
		染虫 Host	0.54	0.49	0.45
10.553	β-蒎烯 β-Pinene	无虫 Nonhost	0.10	0.07	0.06
		染虫 Host	0.07	0.06	0.06
11.775	d-柠檬烯(苧烯)d-Limonene	无虫 Nonhost	2.12	3.59	3.21
		染虫 Host	2.63	3.74	3.43
16.024	龙脑 L(-)-Borneol	无虫 Nonhost	4.72	4.05	3.68
		染虫 Host	5.00	4.24	4.20
17.099	α-松油醇 α-Terpineol	无虫 Nonhost	9.85	8.67	8.21
		染虫 Host	10.52	10.17	9.59
25.914	乙酸松油酯 Terpinyl acetate	无虫 Nonhost	10.56	11.55	12.41
		染虫 Host	12.28	15.65	16.67
11.814	桉油醇 Cineole	无虫 Nonhost	41.49	43.19	43.88
		染虫 Host	45.60	39.54	39.23

## 4 讨论

巨尾桉叶油含量随树龄增加逐年增加,染虫与否对桉叶油含量影响不大。但树龄的不同,和染虫与否的林地桉叶油中物质的组成及相对含量有所差异。桉叶油被广泛应用于医药、化工、美容和香料等方面,在提取利用时应根据不同林地情况选择采集和提取时期,采集提取最佳时期从桉叶油总量考虑可以选择较长树龄。遭遇虫害的林木,木材质量受到严重影响,但对桉叶油的产量和质量影响不大,加工桉叶油将一定程度减少损失。

云斑天牛具有优先选择比较弱小的林木侵染的特性,以往文献报道柠檬烯、α-松油醇对于天牛类害虫具有一定的引诱作用<sup>[10]</sup>。染虫林地桉叶油中柠檬烯和α-松油醇相对含量更高,可能是害虫受到引

诱的原因之一。α-蒎烯对昆虫具有引诱作用<sup>[11]</sup>,被天牛类寄生时,随着寄主的衰弱进程,α-蒎烯的相对含量会逐渐减少<sup>[12]</sup>。这与实验中染虫林地桉叶油中α-蒎烯含量小于无虫林地相符。桉油醇是桉叶油具有商业价值的主要成分,桉叶油对许多害虫具有较好的杀虫效果<sup>[13]</sup>。实验中无虫林中桉油醇含量高于染虫林,并且随着树龄增加,桉油醇含量也增加。染虫林桉油醇逐年减少可能是由于害虫遏制或林木衰弱影响了桉油醇合成。

本研究为探索桉叶油成分对虫害的引诱和忌避效果及利用桉叶油成分进行诱杀、忌避害虫提供了一定的参考依据。今后通过进一步研究桉叶油主要物质不同的剂量对昆虫的引诱与杀灭活性,可以运用柠檬烯、α-松油醇和α-蒎烯等对昆虫具有引诱活性的物质参与诱杀剂的合成或建立引诱区,通过调

控代谢等方式调整 $\alpha$ -蒎烯含量以降低对昆虫的引诱程度等方面来保护经济林木,以及开发杀虫活性物质为主的生物杀虫剂来进行绿色的虫害防治,以达到更好的防御桉树虫害,提升桉叶油的商业价值的目的。

## 参考文献

- 1 Xia JP(夏剑萍), Dai JH(戴均华), Liu LD(刘立德), et al. Progress in research on *Batocera horsfieldi*. *Hubei Forest Sci Tech*(湖北林业科技), 2005, 2:42-44.
- 2 Li JQ(李建庆), Yang ZQ(杨忠岐), Mei ZX(梅增霞), et al. Pest risk analysis and control counter measure of *Batocera horsfieldi*. *Fore Res*(林业科学研究), 2009, 22:148-153.
- 3 Chen ZQ(陈卓全), Wang YJ(王勇进), Wei XY(魏孝义), et al. BVOCs versus human health and security. *Ecol Environ Sci*(生态环境), 2004, 13:385-389.
- 4 Hu WJ(胡文杰), Qiu XM(邱修明), Zeng JJ(曾建军), et al. Comparative analysis of components of essential oils from different parts of imperial chrysanthemum. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2015, 27:1187-1193.
- 5 Tian YH(田玉红), Zhou XC(周贤闯), Zhou XL(周小柳), et al. The composition analysis of essential oil from leaves of *Eucalyptus grandis*. *Hubei Agric Sci*(湖北农业科学), 2011, 50(13):57-59.
- 6 Tian YH(田玉红), Zhang XM(张祥民), Huang TS(黄泰松), et al. Research advances on the essential oils from leaves of *Eucalyptus*. *Food Ferment Ind*(食品与发酵工业), 2007, 238:139-143.
- 7 Liu ZY(刘真一), Chen YY(陈月圆), Li DP(李典鹏). Analysis of volatile constituents of different years old of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* leaf by GC-MS. *Guizhou Botany*(广西植物), 2012, 32:701-705.
- 8 Zhao JN(赵锦年), Jiang P(蒋平), Wu CS(吴沧松), et al. Studies on *Monochamus alternatus* attractant and the attractability. *Fore Res*(林业科学研究), 2000, 13:262-267.
- 9 Halitschke R, Stenberg J, Kessler D, et al. Shared signals—"alarm calls" from plants increase apperance to herbivores and their enemies in nature. *Ecol Lett*, 2008, 11(1):24-34.
- 10 Batish DR, Singh HP, Kohli RK, et al. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecol Manag*, 2008, 256: 2166-2174.
- 11 Poland TM, Groot PD, Burke S, et al. Development of an improved attractive lure for the pine shoot beetle, *Tomocis piniiperda* (Coleoptera:Scolytidae). *Agr Forest Entomol*, 2003, 24(10):54-59.
- 12 Ning T(宁眺), Fan JT(樊建庭), Fang YL(方宇凌), et al. Changes in contents of host volatile terpenes under different damaged states and electroantennogram response of *Monochamus alternatus* Hope to these volatiles. *Acta Entomol Sin*(昆虫学报), 2006, 49:179-188.
- 13 Zhu BCR, Gregg H, Feng C, et al. Evaluation of vetiver oil and seven insect-active essential oils against the Formosan subterranean termite. *J Chem Ecol*, 2001, 27:1617-1625.

(上接第 1711 页)

- 16 Chen BL(陈宝龙), Deng X(邓旭), Zeng GY(曾光尧), et al. Advances in anti-influenza virus of neuraminidase inhibitors. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2015, 50(1):7-14.
- 17 Stephen T, Craig R, Eric P, et al. Assessment of neuropsychiatric adverse events in influenza patients treated with oseltamivir:a comprehensive review. *Drug Safety*, 2008, 31:1097-1114.
- 18 Jing LL(景临林), Ma HP(马慧萍), Fan PC(樊鹏程), et al. In vitro free radical scavenging activity of ethanol extract of *Cremanthodium humile* and its protective effect on mice under hypobaric hypoxia condition. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2015, 27:1815-1820.
- 19 Li B, Ni Y, Zhu L J, et al. Flavonoids from *Matteuccia struthiopteris* and their anti-influenza virus (H1N1) activity. *J Nat Prod*, 2015, 78:987-995.